

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl⁶

A61K 31/55

//C07D401/12

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97193689.7

[43]公开日 1999年4月28日

[11]公开号 CN 1215334A

[22]申请日 97.4.2 [21]申请号 97193689.7

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

[30]优先权

代理人 陈文平

[32]96.4.10 [33]JP[31]88233/96

[86]国际申请 PCT/JP97/01136 97.4.2

[87]国际公布 WO97/37661 日 97.10.16

[85]进入国家阶段日期 98.10.8

[71]申请人 旭化成工业株式会社

地址 日本大阪府

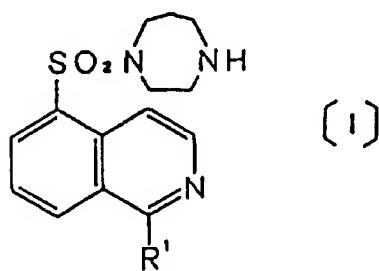
[72]发明人 藤井阳一 足立昭夫 浅野敏雄

权利要求书2页 说明书20页 附图页数5页

[54]发明名称 用于预防和治疗病毒感染性疾病的药物

[57]摘要

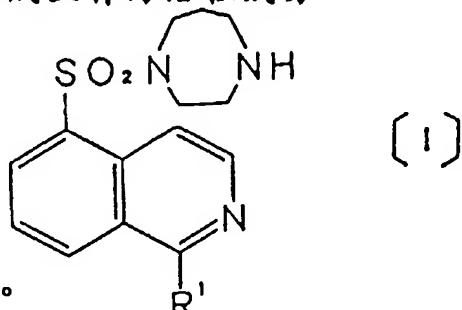
一种用于病毒感染的预防和治疗的优异药物,其含有由式(I)所代表的化合物或其酸加成盐作为活性成分,其中R'代表氢或羟基。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1. 一种用于病毒感染性疾病预防和治疗的药物，其中含有式〔I〕的化合物或其酸加成盐作为活性成分



其中 R^1 为氢或羟基。

2. 根据权利要求 1 的药物，其中病毒感染性疾病是逆转录病毒感染性疾病。

3. 根据权利要求 2 的药物，其中逆转录病毒感染性疾病为 HIV 感染性疾病或成人 T 细胞白血病。

4. 根据权利要求 1 的药物，其中所说药物为一种用于注射的制剂。

5. 根据权利要求 4 的药物，其中所说的用于注射的药物含有百分之 0.001-20，优选 0.01-10 重量的所说的活性成分。

6. 根据权利要求 4 的药物，其中用于活性成分给药的药物以 0.01-25mg/kg/天的剂量制备。

7. 根据权利要求 6 的药物，其中将所说的活性成分制成用于以高于 0.1mg/kg/天，优选高于 1 或 2mg/kg/天的剂量给药的形式。

8. 根据权利要求 1 的药物，它是用于经口给药的药物。

9. 根据权利要求 8 的药物，其中所说的药物含有百分之 0.01-100 重量的所说活性成分。

10. 根据权利要求 8 的药物，其中用于活性成分给药的药物以 0.02-40mg/kg/天的剂量制备。

11. 根据权利要求 10 的药物，其中将活性成分制成用于以高于 0.5mg/kg/天，优选高于 1 或 2mg/kg/天且最优选高于 4mg/kg/天的剂量给药的形式。

12. 一种用于抑制病毒感染、病毒传播、病毒增殖、Env 蛋白表达、病毒产生或病毒合胞体形成的药物，该药物含有有效数量的 R'为氢或羟基的式 [I] 化合物或其酸加成盐作为活性成分。
13. 根据权利要求 12 的药物，其中病毒为逆转录病毒。
14. 根据权利要求 13 的药物，其中逆转录病毒为 HIV。
15. 一种病毒感染性疾病、病毒感染、病毒传播、病毒增殖、Env 蛋白表达、病毒产生或病毒合胞体形成的预防或治疗方法或抑制方法，其包括给予一种含有有效数量的其中 R'为氢或羟基的权利要求 1 中式 [I] 化合物或其酸加成盐作为活性成分的药物的步骤。
16. 根据权利要求 15 的方法，其中病毒为逆转录病毒。
17. 根据权利要求 16 的方法，其中逆转录病毒为 HIV。

说 明 书

用于预防和治疗病毒感染性疾病的药物

本发明涉及用于预防和治疗病毒感染性疾病的药物。

病毒是一种由一定量的 DNA 或 RNA 核酸以及少量蛋白分子组成的微粒大小的微生物。已知病毒本身不具有繁殖活性，但在侵入动物、细菌、真菌、藻类或植物的细胞后能够利用宿主细胞的代谢系统而生长。病毒基因包括感染必需蛋白、在宿主细胞中核酸表达必需蛋白（酶）以及维持病毒结构的关键蛋白。

在病毒感染中出现的症状取决于病毒的类型。一方面同一病毒有时引起不同的症状而另一方面不同类型的病毒可以引起相同的症状。病毒感染并不总是表现出症状，有许多病例没有症状（潜伏感染）。如果出现症状（显性感染），可能的表现可以是全部疾病状态的出现也可以是只有部分疾病状态出现。这些多样性出现的原因还不清楚；然而，其可能取决于病毒的类型以及被感染宿主的免疫功能状态。

将动物中的病毒根据病毒颗粒中的组成基因分为 DNA 病毒和 RNA 病毒，并给出某某动物病毒的一般名称。

在 DNA 病毒和 RNA 病毒中基因的复制及转录的机制是不同的，但动物病毒感染和在细胞中生长的过程彼此之间大体上是相似的。

也就是，下面的过程是共同的：

- (1) 病毒对细胞表面的附着、穿透和脱壳，
- (2) 核酸的复制和转录，
- (3) 病毒蛋白合成和加工，以及
- (4) 病毒颗粒的成熟和释放。

通过这些过程，在动物体内为病毒感染性疾病的建立进行了病毒的增殖，并引起宿主细胞的破坏和死亡。

到现在为止，金刚烷胺和金刚乙胺已被用于病毒感染性疾病的预防和治疗。这些药物通过提高细胞内核糖体的 pH 水平来抑制由蛋白酶对病毒包膜的切割而抑制对于病毒颗粒的穿透必需的膜融合。已知阿昔洛韦、甘昔洛韦、喷昔洛韦（ penciclovir ）和膦甲酸钠抑制病毒 DNA 复制。利巴韦林和布雷青霉素抑制 RNA 病毒的转录和复制（ RNA → RNA ）。 neplanocin A 和芒霉素抑制病毒 mRNA 帽子的甲基化以降低 mRNA 的翻译率并由此抑制病毒增殖。

人免疫缺陷病毒（ HIV ）和丙型肝炎病毒（ HCV ）通过由源自它们基因组的蛋白酶切割合成肽产生结构上有功能的蛋白。已经在研究特异性抑制蛋白酶活性的物质。 Indinavir 和 Crixivan 是抑制蛋白酶对 HIV （人免疫缺陷病毒）前蛋白体切割由此来抑制前蛋白的活化并抑制病毒增殖的蛋白酶抑制剂。通过干扰素的作用而在细胞中堆积的 2-5 寡腺苷酸通过增加 RNA 酶的活性促进病毒 mRNA 的降解来抑制其翻译成病毒蛋白。

逆转录酶活性（ RNA → DNA ）的抑制剂如 3'- 叠氮 -3'- 脱氧胸苷（此后称为“ AZT ”）、 2', 3'- 双脱氧胞苷（此后称为“ ddC ”）以及 2',3'- 双脱氧肌苷（此后称为“ ddI ”）被用于艾滋病的治疗。

逆转录酶是一种催化由 RNA 模板合成 DNA 的酶，并被发现内源性地存在于病毒中。变构逆转录酶抑制剂，如 5- 乙基 -6- 苯基硫尿嘧啶和奈韦拉平结合于逆转录酶的底物结合位点的不同部分来抑制逆转录酶活性。

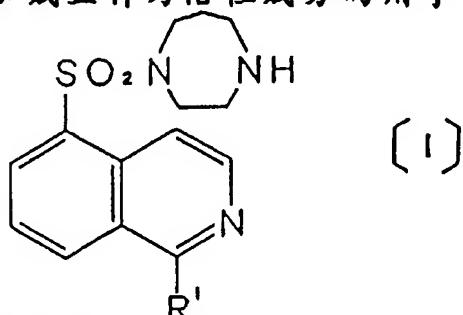
虽然 C 激酶抑制剂 H-7 [5- 异喹啉基磺酰基]-2- 甲基 - 氨嗪还未被发现明显有效抗 HIV 感染性疾病，但其关系是已知的（《抗病毒研究》（ Antiviral Res. ）， 22: 273-283, 1993 ）。

虽然已经进行了许多试验，但除了由于一种有效疫苗的发展而由 WHO 宣布灭绝的天花外，还未实现对于病毒感染性疾病的完全治愈。期待有效预防和治疗病毒感染性疾病的新药物。

作为广泛研究的结果我们已经发现一种下面分子式〔 I 〕的化合物或其酸加成盐表现出对病毒感染性疾病良好的预防和治疗效

果，并且对于改进药物是有用的。通过上述发现已完成了本发明。

本发明的一个目的是提供一种含有其中 R' 为氢或羟基的分子式 [I] 的化合物或其酸加成盐作为活性成分的用于预防和治疗病毒感染性疾病药物。



已知其中 R' 为氢或羟基的分子式 [I] 的化合物表现出血管舒张活性等，而且是一种有效的血管舒张剂（日本专利审查公开 7 - 80854 号、日本专利未审查公开 61 - 152658 号、出处同上 61 - 227581 号、出处同上 2 - 256617 号、出处同上 4 - 264030 号、出处同上 6 - 056668 号、出处同上 6 - 080569 号、出处同上 6 - 293643 号、出处同上 7 - 277979 号、《英国药理学杂志》（ Br. J. Pharmacol.），8, 1091 (1989)、《药理学和实验治疗杂志》（ J. Pharmacol. Exp. Ther.），259, 738 (1991)、《欧洲药理学杂志》（ Eur. J. Pharmacol.），195, 267 (1991) 以及《生物化学和药理学》（ Biochem. Pharmacol.），46, 1487 (1993)）。

分子式 [I] 的化合物或其酸加成盐是已知的。已知其中 R' 为氢的分子式 [I] 化合物的一种酸加成盐为盐酸法舒地尔（ FAS：盐酸六氢 - 1 - (5 - 异喹啉 - 磺酰基) - 1H - 1, 4 - 二氮杂革，其已被商品化出售并已知具有低毒性。另外已知 FAS 对蛋白质磷酸化表现出抑制作用的事实，如肌球蛋白轻链激酶抑制和 C 激酶抑制（《脑神经》（ Cranial Nerve ），45 (9), 819-824, 1993 ）。

除了上述发现，还从未知晓本发明对预防和治疗病毒感染性疾病的效果。

本发明中所用的分子式 [I] 复合物可以通过例如在《化学与药学通报》（ Chem. Pharm. Bull. ），40 (3), 770-773 (1992) 和日本专利未审查公开 61 - 152658 号中所公布的方法合成。其酸加成盐优选为药理学可接受的盐，例如无机盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和

硫酸盐，或有机盐如乙酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、马来酸盐以及甲磺酸盐。

本发明用于病毒感染性疾病的预防和治疗的药物可以通过混合分子式 [I] 的复合物或其酸加成盐，和已知的药理学上可用载体来制备。

载体的例子为：明胶，乳酸，糖如葡萄糖，玉米，淀粉如小麦，大米或玉米淀粉，脂肪酸如硬脂酸、硬脂酸钙，脂肪酸盐如硬脂酸镁，滑石，植物油，十八烷醇、醇如苯甲醇，树胶以及聚亚烷基二醇。

液体载体的例子为：水、生理盐水、糖溶液如右旋糖以其它糖、以及二元醇如乙二醇、丙二醇、聚乙二醇以及聚丙二醇。

优选利用明胶制备本发明的用于预防和治疗病毒感染性疾病的药物的胶囊。

可以经口或胃肠外进行本发明药物的给药。经口给药的优选制剂为片剂、胶囊、粉剂、颗粒、溶液或酏剂，而那些用于胃肠外给药的为溶液。

以一种分子式 [I] 的复合物或其酸加成盐的无菌溶液形式进行胃肠外给药，其中加入氯化钠、葡萄糖以及其它溶质来制备一种等渗溶液，如通过肌肉注射、静脉注射或皮下注射。

优选将注射用药的复合物溶于无菌水、盐酸利多卡因溶液（用于肌肉注射）、生理盐水、葡萄糖溶液、用于静脉注射的溶液以及电解质溶液（用于静脉注射）。可以用百分之 0.001-20 重量的活性成分，并优选百分之 0.01-10 重量的活性成分来制备溶液。以片剂、胶囊、粉剂或颗粒形式用于经口给药的制剂含有例如百分之 0.01-100 重量的活性成分，并优选百分之 1 - 40 重量的活性成分。溶液形式的用于口服给药的一种优选的例子为含有百分之 0.01-20 重量活性成分的悬液或糖浆。载体的例子为水性填料如香水、糖浆或药物微团。

本发明药物的剂量应基于患者的年龄、身体状况、体重、症状、其它治疗的类型、这些其它治疗的数量、预期效果的特点、给药途径和剂量方案而定。通常对于胃肠外给药剂量为 0.01-25mg/kg/天，对于经口给药为 0.02-40mg/kg/天；胃肠外给药优选的剂量为大于

0.1mg/kg/天，更优选大于1mg/kg/天而最优选大于2mg/kg/天。在经口给药中优选大于0.5mg/kg/天，更优选大于1—2mg/kg/天而最优选大于4mg/kg/天。

最令人惊奇的是，本发明的药物在各种测试中表现出抗病毒活性并且作为一种药物对预防和治疗病毒感染性疾病是有效的。

例如需要抗病毒化疗的病毒感染性疾病如下（《现代系统内科学》（Modern Systematic Internal Medicine），26卷，73—88页）：

由呼吸道合胞（RS）病毒、副流感病毒、流感病毒、鼻病毒、腺病毒和轮状病毒感染引起的急性病毒感染性疾病。在免疫抑制状态由单纯疱疹病毒、水痘—带状疱疹病毒、巨细胞病毒、EB病毒和人疱疹病毒6感染引起的严重的复发性病毒感染性疾病。由乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV和HTLV感染引起的变为慢性或携带者的病毒感染性疾病。经卵巢传播的病毒感染性疾病如风疹病毒。出血热病毒感染性疾病如埃博拉、拉沙热以及出血热伴有肾的症状。

由逆转录病毒如AIDS（获得性免疫缺陷综合征）的病原病毒（HIV）以及人T细胞白血病的病原病毒（HTLV）所引起的感染性疾病（《化疗领域》（Field of Chemotherapy），11(6), 1069-1078, 1995,《蛋白质、核酸和酶》（Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 40 (9), 1079-1091, 1995）。逆转录病毒是定义一种具有逆转录酶的RNA病毒的术语。在二十世纪八十年代发现了逆转录病毒感染性疾病成人T细胞白血病和AIDS的病原体，并且研究迅速增加。

本发明药物的靶标优选为由逆转录病毒引起的感染性疾病（逆转录病毒感染性疾病），而更优选为HIV感染性疾病如AIDS以及成人T细胞白血病。

本发明还包括含有一种其中R'为氢或羟基的分子式〔I〕的复合物或其酸加成盐作为活性成分的用于抑制病毒感染的一种制剂或用于抑制病毒传播的一种制剂。

本发明进而包括含有一种如在权利要求1中所要求的分子式〔I〕的复合物，其中R'为氢或羟基，或者其酸加成盐作为活性成

分的用于抑制病毒增殖的一种制剂。

本发明进一步还包括含有分子式 [I] 的复合物，其中 R' 为氢或羟基，或者其酸加成盐作为活性成分的用于抑制 Env 蛋白表达的一种制剂。

本发明进一步仍包括含有分子式 [I] 的复合物，其中 R' 为氢或羟基，或者其酸加成盐作为活性成分的用于抑制病毒产生的一种制剂。

术语“抑制病毒产生”意指抑制从被感染的细胞释放病毒颗粒。本发明的制剂在这种抑制作用中是有效的。

本发明还包括含有分子式 [I] 的复合物，其中 R' 为氢或羟基，或者其酸加成盐作为活性成分的用于抑制病毒合胞体形成的一种制剂。

在本发明中，病毒优选为逆转录病毒，而更优选为 HIV，进一步优选为 HIV - 1。

本发明还包括一种利用药物制剂来抑制上述病毒的作用的方法。

本发明中所用的复合物抑制由病毒感染所引起的细胞死亡或凋亡，并且对于病毒感染性疾病如 HIV 的治疗是有用的。

方法

在 37 °C、5 % CO₂ 中预先传代培养的 MOLT - 4 细胞 (Kikukawa, R. 等，《病毒学杂志》(J. Virol.) 57, 1159-1162, 1986)，悬浮在一培养液 [RPMI 培养基 (Nissui Co.) 并加有 10 % 胎牛血清 (JRH 生物科学公司)] 中来制备细胞悬液。将含有 2 × 10⁶ 个细胞的细胞悬液分入 25ml 培养瓶中。加入一优选量的 HIV2/GH123 (Shibata, R. 等《病毒学杂志》64: 742 - 747, 1990) 来感染细胞。向其中加入培养液以便每瓶含有 10ml。加入含有已知系列浓度本发明化合物 (FAS, 以及其中 R' 为羟基的分子式 [I] 复合物) 的水溶液各 20μl 来提供试验组。还提供一无复合物的对照组。感染后每 3 - 4 天更换培养上清 5ml。在试验组中为了保持一恒定的复合物浓度，将药物预先溶于培养液中。将试验复合物

也加到无病毒感染的 HOLT - 4 细胞中，并将这些细胞培养同感染的细胞一样长的时间来检测这些复合物对细胞的效应。25 - 30 天后，将所有细胞轻轻地搅起并将 100 μ l 细胞悬液收集于一 96 孔板中。通过 MTT 方法 (Murakam 等, Nippon Rinsho, 增刊《HIV 感染性疾病, AIDS》(HIV infections Disease, AIDS), 113-119 页以及 Pauwels, R. 等,《病毒学方法杂志》(J. Virol. Methods), 20:309-321, 1988 计数活细胞数来检测复合物的效应。

向平板中加入 5mg/ml MTT (3 - (4, 5 - 二甲基 - 2 - 噻唑基) - 2, 5 - 二苯基 - 2H - 四唑溴, Dojin Chem. Inst.) 溶液 10 μ l，并于 37 °C 在 5 % CO₂ 下孵育 2 小时以产生甲臜。加入 10 % Triton X 的异丙醇溶液和 0.04N 的盐酸来溶解甲臜，并通过一读板仪在 OD_{550nm} 处测定所产生的甲臜。在 OD_{630nm} 处检测对照组。MTT 被转变为在 550nm 波长处具有吸收峰的甲。

如将在下面的实施例中所要讨论的，本发明的复合物抑制由病毒感染所引起的细胞死亡或凋亡。

图 1：实施例 3 中复合物对由 HIV - I 感染所引起的急性期感染的作用（对合胞体形成的抑制活性检测结果）。

图 2：实施例 3 中复合物对由 HIV - I 所引起的慢性期感染的作用（对合胞体形成的抑制活性检测结果）。

图 3：实施例 4 中对 HIV - I 增殖的抑制作用。

图 4：实施例 4 中对 HIV - I 产生的抑制作用。

图 5：对 HIV - I 增殖的抑制作用（对合胞体形成的抑制作用）FAS 与其它复合物的比较。

下述实施例说明本发明，但并不构成对本发明的限制。

实施例 1

制剂（无菌注射液）

将下面表 1 中列出的成分溶于注射用蒸馏水中，并按需加入蒸馏水来制备用于注射所需浓度。将溶解分为 2ml 剂量并放入安瓿，密封，并通过加热灭菌来制备无菌注射液。

表 1

成分		量
10mg 制剂	盐酸法舒地尔(FAS)	10mg
	氯化钠	16mg
	蒸馏水	适量
		合计 2ml
30mg 制剂	盐酸法舒地尔(FAS)	30mg
	氯化钠	16mg
	蒸馏水	适量
		合计 2ml
60mg 制剂	盐酸法舒地尔(FAS)	60mg
	氯化钠	16mg
	蒸馏水	适量
		合计 2ml
式 [I] 化合物盐酸盐 10mg (R'=羟基)		
10mg 制剂	氯化钠	16mg
	蒸馏水	适量
		合计 2ml
式 [I] 化合物盐酸盐 30mg (R'=羟基)		
30mg 制剂	氯化钠	16mg
	蒸馏水	适量
		合计 2ml
式 [I] 化合物盐酸盐 60mg (R'=羟基)		
60mg 制剂	氯化钠	16mg
	蒸馏水	适量
		合计 2ml

实施例 2

制剂配方 (片剂)

通过常规的方法制备含有表 2 中化合物的片剂

表 2

成分		量
10mg 制剂	盐酸法舒地尔(FAS)	10.0mg
	结晶纤维素	25.0mg
	乳糖	108.5mg
	硬脂酸镁	1.5mg
	羧甲基纤维素钙	5.0mg
		合计 150.0mg
20mg 制剂	盐酸法舒地尔(FAS)	20.0mg
	结晶纤维素	25.0mg
	乳糖	98.5mg
	硬脂酸镁	1.5mg
	羧甲基纤维素钙	5.0mg
		合计 150.0mg
10mg 制剂	式 [I] 化合物盐酸盐 10.0mg (R'=羟基)	
	结晶纤维素	25.0mg
	乳糖	108.5mg
	硬脂酸镁	1.5mg
	羧甲基纤维素钙	5.0mg
		合计 150.0mg
20mg 制剂	式 [I] 化合物盐酸盐 20.0mg (R'=羟基)	
	结晶纤维素	25.0mg
	乳糖	98.5mg
	硬脂酸镁	1.5mg
	羧甲基纤维素钙	5.0mg
		合计 150.0mg

实施例 3

对 HIV 合胞体形成的抑制活性

a) 药物对 HIV - 1 急性期感染的活性:

方法

将通过在含有 10 % FBS (胎牛血清: GIBCO Corp) 的 RPMI 培养基 (GIBCO. Corp.) 中培养 MOLT - 4 (美国典型培养物收集中心 ATCC CRL - 1582) (培养条件: 37 °C、5 % CO₂/95% 空气)。所获的细胞分成等分数量的细胞 (1 × 10⁵ 细胞 50μl) 将细胞悬液 50μl 以及在有 10 % FBS 的 RPMI 培养基中含有 HIV - 1 (LAV - 1 毒株, Vain-Hobson 等, 《细胞》(Cell) 40: 9-17, 1985) 的液体标本 50μl 加入到一 96 孔微量培养板的每个孔中并培养 48 小时 (MOLT - 4 和 HIV - 1 的感染条件: M.O.I.=4.0)。

以图 1 中所示的终浓度将每种复合物溶于含有 10 % FBS 的 RPMI 培养基中来制备药物溶液。在同 MOLT - 4 和 HIV - 1 混合时将药物溶液 100μl 加入到 MOLT - 4 细胞标本和 HIV - 1 标本的混合物中来制备 200μl 终体积的液体。显微镜下计数所形成合胞体的数量。

所测复合物为: FAS (盐酸法舒地尔, 《化学和药学通报》, 40 (3), 770 - 773, (1992)、C 激酶抑制剂 H - 7 (1 - 5 - 异喹啉基 - 磷酰) - 2 - 甲基 - 吲哚, Sigma 公司)、和钙调素激酶 II 抑制剂 KN - 62 (1 - (N, O - 二 - [5 - 异喹啉基磷酰基] - N - 甲基 - L - 酪氨酸) - 4 - 苯基 - 吲哚, Sigma 公司, 《神经科学快报》(Neuroscience. Lett.) ,129,47(1991))。

通过取代 100μl 药物溶液制备无复合物的对照组。

在下面的算式中通过比较在试验组中合胞体形成和对照组中合胞体的形成本来计算合胞体形成活性。

合胞体形成活性 = 加药组中形成合

胞体的数量 / 未加药组中形成合胞体的数量

结果

结果示于图 1 中, 其中垂直轴表示合胞体形成活性而水平轴示

复合物的终浓度 (μM)。

FAS (-○-) 在至少 $1.0\mu\text{M}$ 的浓度抑制 90 % 合胞体的形成。H - 7 (-△-) 和 KN - 62 - (-□-) 在 $30\mu\text{M}$ 的浓度分别抑制大约 50 % 和 75 %，而在 $2.0\mu\text{M}$ 的浓度未观察到抑制效应。在对照组中（未加复合物）合胞体的数量为 185 ± 20 。总之，FAS 抑制 HIV 病毒颗粒的细胞感染。相应地，FAS 对于 HIV 感染的抑制或预防是有效的。

b) 药物对 HIV - 1 慢性期感染的活性；

方法

将通过培养 MOLT - 4（培养条件： 37°C 、 $5\% \text{CO}_2/95\%$ 空气、含有 10 % FBS 的 KPMI 培养基（GIBCO 公司））所获的细胞调节至一优选的细胞数量（ 1×10^5 细胞/ $50\mu\text{l}$ ）。将 HIV - 1 (LAV - 1) 标本 $50\mu\text{l}$ 加入到细胞悬液 $50\mu\text{l}$ 中并进行混合培养（HIV - 1 对 MOLT - 4 的感染条件：M.O.I.=1.0）。通过每 3 天以 2 : 5 的体积比更换新鲜培养基培养感染的细胞混合物。培养持续 1 个月以上来制备持续感染细胞。将持续感染细胞浓度调节至一优选的细胞数量（ 1×10^5 细胞/ $50\mu\text{l}$ ）（持续感染细胞标本）。

通过培养 MOLT - 4（培养条件： 37°C 、 $5\% \text{CO}_2/95\%$ 空气、含有 10 % FBS 的 RPMI 培养基（GIBCO 公司））制备未感染的细胞标本，并调节浓度至一优选的细胞数量（ 1×10^5 细胞/ $50\mu\text{l}$ ）。

将 $50\mu\text{l}$ 持续感染的细胞标本置于一 96 孔微量培养板的孔中，并向其中加入 $50\mu\text{l}$ 非感染细胞标本，培养 48 小时。显微镜下计数所形成的合胞体的数量。

在混合持续感染细胞标本和非感染细胞标本的时候加入 $100\mu\text{l}$ 每种待测复合物溶液来提供图 2 中所示的终浓度（加药试验组）。

通过取代复合物溶液 $100\mu\text{l}$ 来制备非加药组（对照组）。

所用的药物和合胞体形成活性的计算方法同上面 a) 中的相同。

结果

结果示于图 2。在图 2 中，垂直轴表示合胞体形成活性而水平轴表示复合物的浓度 (μM)。

如在图 2 中所示， FAS 对合胞体形成表现出极高的抑制活性。 FAS (-○-) 在至少 $3.75\mu\text{M}$ 浓度对合胞体形成表现出抑制活性。 H - 7 (-△-) 和 KN - 62 (-□-) 对合胞体形成未表现出抑制活性。

FAS 抑制了由持续感染细胞到未感染细胞的病毒传播。因此，表明 FAS 在病毒（特别是 HIV）感染的患者体内可以抑制血液和淋巴结中病毒的传播。

本发明的药物在低药物浓度下表现出抑制病毒感染和在感染细胞和未感染细胞间病毒传播（感染）的效应。相应地，预期本发明的药物为一种用于病毒感染性疾病如 HIV 感染性疾病的预防和治疗的药物。

在实施例 3、4、5 和 6 中所示的实验中，由本发明的药物对 MDLT - 4 细胞无细胞毒性。

实施例 4

对 HIV 增殖的抑制作用

(对 Env(gp120)蛋白在细胞表面表达的抑制作用)

方法

将通过培养 MOLT - 4 (培养条件： 37 °C、 5 % CO₂/95% 空气、含有 10 % FBS 的 RPMI 培养基 (GIBCO 公司)) 所获的细胞调节至一优选的细胞数 (1 × 10⁵ 个细胞/50μl)。将细胞悬液 50μl (用 MOLT - 4 和 HIV - 1 感染： M.O.I. = 1.0) 置于一 96 孔微量培养板中并培养 1 小时来感染细胞。

在每孔中加入 100μl 下述复合物的溶液并培养 5 天。将培养的溶液转移至一塑料试管中 (Eppendorf 公司) 并离心收集细胞。用小鼠抗 Env gp 120 单克隆抗体 (Replingen 公司) 作为一抗和 FITC (异硫氰酸荧光素) 标记的羊抗小鼠 IgG (Cappel 公司) 作为发荧光的二抗处理细胞。按照间接荧光抗体技术通过荧光显微镜下计数发荧光的细胞计算发荧光细胞数 (《HIV 研究中的技术》(Techniques in HIV Research), A. Aldoriny 和 B.D. Walker 编, Stockton 出版社, 纽约, 1990)。

通过下面的等式计算 Env 阳性细胞 (%) :

$$\text{Env 阳性细胞} (\%) = (\text{FITC 阳性细胞/总细胞}) \times 100$$

复合物： FAS、 H - 7 和 KN - 62 。

对照： 利用无复合物溶液。

结果

结果示于图 3 中。在图 3 中，垂直轴为 Env 阳性细胞百分比（表示均值加减标准偏差， n=3 ）而水平轴为复合物的浓度 (μM) 。

如在图 3 中所示， FAS (-○-) 表现出强的抑制 Env 表达的活性。 KN - 62 (-□-) 对 Env 表达表现出弱的抑制活性，而 H - 7 (-△-) 对 Env 表达无明显抑制活性。

Env 蛋白是逆转录病毒如 HIV - 1 的一种结构蛋白并存在于人 T 细胞和 HIV - 1 颗粒表面。

Env 蛋白的表达表示病毒增殖。这些结果提示 FAS 抑制病毒的增殖。

相应地，证明本发明的药物对于病毒感染性疾病如包括 HIV - 1 的逆转录病毒的预防和治疗是有效的。

实施例 5

对 HIV 产生（从细胞的胞外释放）的抑制作用

方法

将通过培养 MOLT - 4 （培养条件： 37 °C 、 5 % CO₂/95% 空气、含有 10 % FBS 的 RPMI 培养基（ GIBCO 公司））所获的细胞调节至一优选的细胞数（ 1 × 10⁵ 个细胞 /50μl ）。将细胞悬液 50μl （用 MOLT - 4 和 HIV - 1 感染： M.O.I.=4.0 ）置于一 96 孔微量培养板中并培养 1 小时来感染细胞。

在每孔中加入 100μl 下述复合物的溶液并培养 5 天。将培养的溶液转移至一塑料试管中（ Eppendorf 公司）并离心。通过利用艾博特（ Abbott ）试剂盒（ ELISA : Dinabot 公司）检测培养上清培养基中 p24gag 蛋白的量。将 FAS 、 H - 7 和 KN - 62 用作复合物，并用一无复合物的溶液作为对照。

结果

结果示于图 4 中。在图 4 中，垂直轴为 p24 gag 蛋白抗原的浓度 (ng/ml) 而水平轴为复合物的浓度 (μM)。

如图 4 中所示，FAS (-○-) 降低培养上清培养基中 p24gag 蛋白并抑制 HIV - 1 产生。FAS 降低 p24 gag 蛋白的活性明显强于 H - 7 (-△-) 和 KN - 62 (-□-) 的。

p24 gag 蛋白对于 HIV - 1 病毒颗粒组装中病毒核心的形成是一种重要的蛋白。p24 gag 蛋白的量同感染性病毒的量是成比例的。相应地，FAS 抑制 HIV - 1 形成。本发明的药物被证明对于包括 HIV - 1 感染性疾病的病毒感染性疾病的预防和治疗是有效的。

实施例 6

FAS 和其它抗 HIV 药物对 HIV 增殖的抑制活性比较方法

通过同在实施例 3 中相同的方法进行实验。

在本实验中所用的药物为本发明的复合物 (FAS，以及如在上面提到的日本专利未审查公开 61 - 152658 号中的一种 R' 为羟基的分子式 [I] 复合物)，ddI (Sigma 公司) 和用作 AIDS 治疗药物的 AZT (Sigma 公司)、以及硫酸葡聚糖 (Sigma 公司)。

结果

结果示于图 5 中。其中垂直轴为合胞体形成活性而水平轴为化合物的浓度 (μM)。

如在图 5 中所示，硫酸葡聚糖 (-△-)、ddI (-▲-)、AIT (-●-) 和 FAS (-○-) 的 50 % 抑制浓度分别约为 $60\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 和 800nM 。关于 HIV - 1 合胞体形成的抑制活性，明显地 FAS 表现出比硫酸葡聚糖、ddI 和 AZT 更高的敏感性。R' 为羟基的本发明复合物抑制 HIV - 1 合胞体的形成。

HIV - 1 合胞体的形成是 HIV - 1 感染的一个标志，而且 HIV - 1 的感染和增殖是 AIDS (一种逆转录病毒感染性疾病) 开始的标志。

作为一种比已知的抗 HIV 药物更有效的抗 HIV 药物，本发明的用于预防和抑制的药物是充满希望的。

实施例 7

证实本发明的复合物没有血液学毒性。

方法

a) 凝血时间

使用兔（雄性，日本白色、体重 2 – 3kg，Oriental Yeast 公司）。从耳静脉收集血液，向其中加入 1/10 体积的 3.8% 柠檬酸钠，并且将混合物以 3,000rpm 离心 20 分钟。向所获的血浆中加入测试化合物后，通过用一血凝度计（Coagtec, Coagtec TE600, EMRA; KC-10A, Baxter）测定活化的部分组织促凝血酶原激酶时间（APTT）和凝血酶原时间（PT）。

所用的复合物为本发明的复合物（FAS，以及 R' 为羟基的分子式 [I] 复合物（日本专利未审查公开 61 – 152658 号）），以及肝素（Shimizu Seiyaku K.K.）。

b) 血小板凝聚：

使用兔（雄性、日本白色、体重 2 – 3kg、Oriental Yeast 公司）。从耳静脉收集血液，向其中加入 1/10 体积的 3.8% 柠檬酸钠，并将混合物从 1,000rpm 离心 10 分钟。

将通过这种操作分离的上清称为富血小板血浆（PRP），并将沉淀进一步以 3,000rpm 离心 10 分钟来获得另一上清，其被称为乏血小板血浆（PPP）。

通过加入 PPP 将 PRP 中血小板的数调节至 3×10^5 血小板/ μl 。将测试样品加入 PRP。1 分钟后，以 $5\mu\text{M}$ 的终浓度加入一制备的 ADP（二磷酸腺苷，Sigma 公司）水溶液，或以 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度加入一胶原（Sigma 公司）的水溶液。通过利用一血小板聚集仪（NBS HEMA TRACER VI）测定聚集反应。通过加入复合物的样品中的最大透光率与加入生理盐水的样品中的最大透光率之比来计算抑制率。

所用的复合物为本发明的复合物（FAS，以及 R' 为羟基的分子式 [I] 的复合物（日本专利未审查公开 61 – 152658 号））和腺苷（Sigma 公司）。

结果

a) 凝血时间:

如在表 3 中所示, 未观察到本发明的复合物对兔血浆 APTT 和 PT 的影响。肝素明显延长 APTT 和 PT。FAS 和 R' 为羟基的分子式 [I] 复合物对于凝血时间无效应。

表 3

对凝血时间的作用			
	N	APTT (秒)	PT (秒)
对照	4	16.9 ±0.8	7.3 ±0.4
FAS (R ¹ = H)			
10μM	4	16.4 ±0.8	7.1 ±0.6
30μM	4	16.0 ±0.8	7.1 ±0.5
100μM	4	16.3 ±0.8	7.6 ±0.9
肝素			
0.05U/ml	4	19.9 ±1.4	7.2 ±0.6
0.5U/ml	4	91.8 ±11.4**	7.2 ±0.6
5.0U/ml	4	N.T.	18.5 ±0.6**
对照	4	21.2 ±0.5	5.8 ±0.1
式 [I] 化合物 (R ¹ =OH)			
30μM	4	20.2 ±0.4	5.6 ±0.1
100μM	4	20.1 ±0.4	5.5 ±0.1
肝素			
0.05U/ml	4	22.3 ±0.3	5.6 ±0.1
0.5U/ml	4	77.1 ± 1.9**	7.6 ±0.1**

** : p<0.01 同对照相比 (Donnett 检验)

N.T.: 未测

均值±标准误差

b) 血小板聚集:

如在表 4 中所示，未观察到本发明的复合物对兔血小板的 ADP 凝集和胶原凝集的影响。腺苷抑制 ADP 凝集和胶原凝集。

表 4

对血小板聚集的作用			
	血小板聚集率 (%)		
	N	ADP	胶原
对照	5	64.5 ± 7.4	78.7 ± 6.3
FAS (R ¹ = H)			
10μM	5	64.1 ± 8.7	79.9 ± 5.6
30μM	5	69.5 ± 10.5	83.8 ± 4.3
100μM	5	59.3 ± 8.0	58.7 ± 7.4
腺苷			
10μm	5	35.5 ± 3.8*	46.4 ± 6.0**
对照	4	66.3 ± 1.4	82.3 ± 1.6
式 [I] 化合物 (R ¹ =OH)			
10μm	4	63.0 ± 2.3	80.0 ± 1.7
30μM	4	63.8 ± 2.9	79.3 ± 1.1
100μM	4	64.3 ± 3.8	81.0 ± 1.2

* :p<0.05, **:p<0.01 同对照相比 (Donnett 检验)

均值±标准误差

相应地，在实施例 3、4、5 和 6 中所用的本发明复合物的大约 30μM 的体外浓度对凝血和血小板聚集未表现出不良效应。

结果，本发明的药物是非常安全的。

实施例 8

用大鼠和小鼠进行本发明复合物的急性毒性实验，并证实了其低毒性。结果示于表 5 中。

表 5

化合物 (式 [I])	动物 (种系、周龄)	给药 途径	性别	结果 LD50 (mg/kg)
$R^1 = H$	大鼠 (Jcl:Wistar, 5 周)	静脉注射	雄性	59.9
			雌性	63.9
		口服	雄性	335.0
			雌性	348.0
		皮下	雄性	123.2
			雌性	128.3
$R^1 = H$	小鼠	静脉注射	雄性	63.7
$R^1 = OH$	(Slc:ddy, 5 周)	静脉注射	雄性	119.3

实施例 9

对 I 型单纯疱疹病毒和副流感病毒空斑形成的抑制作用 方法

根据在《抗病毒化学化疗》(Antiviral Chemistry and Chemotherapy), 5(6), 366-371, 1994 和《实验病毒学》(Experimental Virology), NIH 日本校友联合会编, Maruzen Publ. 1982, 65-78 页或 331 - 340 页中所描述的方法进行实验。

用胰酶 (Sigma 公司) 消化在培养基中 (加入 10 % FBS 的 Dulbecco 改性 MEM) 培养的 Vero 细胞。在相同的培养基中以 2×10^5 细胞/ml 悬浮消化的细胞，并放入 48 孔板的孔中。将培养板在 37 °C 于 5 % CO₂ 下孵育大约 1 天以便在每个孔中形成一全层的细胞。孵育后，去除培养上清。向其中加入由病毒培养基 (MM: 有 2 % FBS 的 Dulbecco 改性 MEM) 4 倍逐步稀释的含有复合物溶液 (50μl)。

向每孔中加入病毒溶液 50μl，其中用 MM 将病毒 (副流感病毒或 I 型单纯疱疹病毒) 的数目调节至大约 50pfu (空斑形成单位)/50μl。在每孔中加入含有 1 % 甲基纤维素的 MM400μl 来提供加复合物的试验组。通过加入病毒培养基而不加测试化

合物制备对照组。

于 37 °C 在 5 % CO₂ 下孵育这些组 3 天以形成空斑并计数每个孔中的空斑数。

测试复合物为 FAS 和 R' 为羟基的分子式 [I] 复合物。将溶液中复合物的终浓度分别设为 100、25、6.3 和 1.6 μg/ml。每个测试组包括 2 个孔并且获得了空斑数的均值。

对 I 型单纯疱疹病毒的作用示于表 6 中，而对副流感病毒的作用示于表 7 中。

表 6

对 I 型单纯疱疹病毒的作用		
浓度 (μg/ml)	空斑数	
	FAS (R ¹ = H)	式 [I] 化合物 (R ¹ = OH)
100	0	37.5
25	49	56
6.3	46	51
1.6	51	51

所示的值为两列的均值
对照组的空斑数为 51

如表 6 所示，本发明化合物剂量依赖性地抑制空斑形成。

表 7

对副流感病毒的作用		
浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	空斑数 FAS ($R^1 = H$)	式 [I] 化合物 ($R^1 = OH$)
100	3.5	4.5
25	36	59
6.3	50.5	N.T.
1.6	N.T.	N.T.

所示的值为两列的均值
对照组中空斑数为 51.5
N.T. = 未检测

对副流感病毒的作用示于表 7 中，其中本发明的复合物抑制 RNA 病毒中副流感病毒引起的空斑形成。

空斑的形成是病毒感染和病毒增殖的一个标志。本发明的复合物抑制 DNA 病毒中单纯疱疹病毒以及 RNA 病毒中副流感病毒的增殖和感染。

总之，本发明的复合物如 FAS 对 DNA 病毒感染和 RNA 病毒感染表现出抑制或预防效应。

本发明的效果

如在上面实验结果中清楚显示的，本发明的药物是一种用于预防和治疗病毒感染性疾病的有效的药物。

说 明 书 附 图

图 1

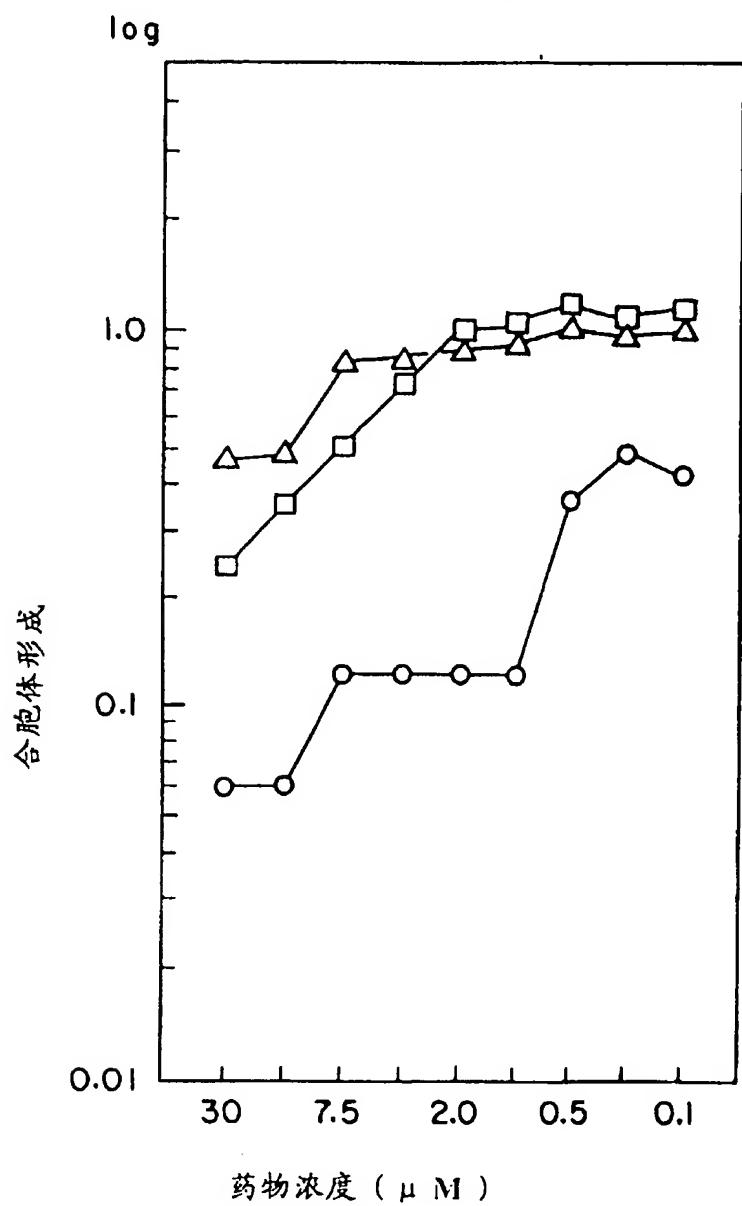


图 2

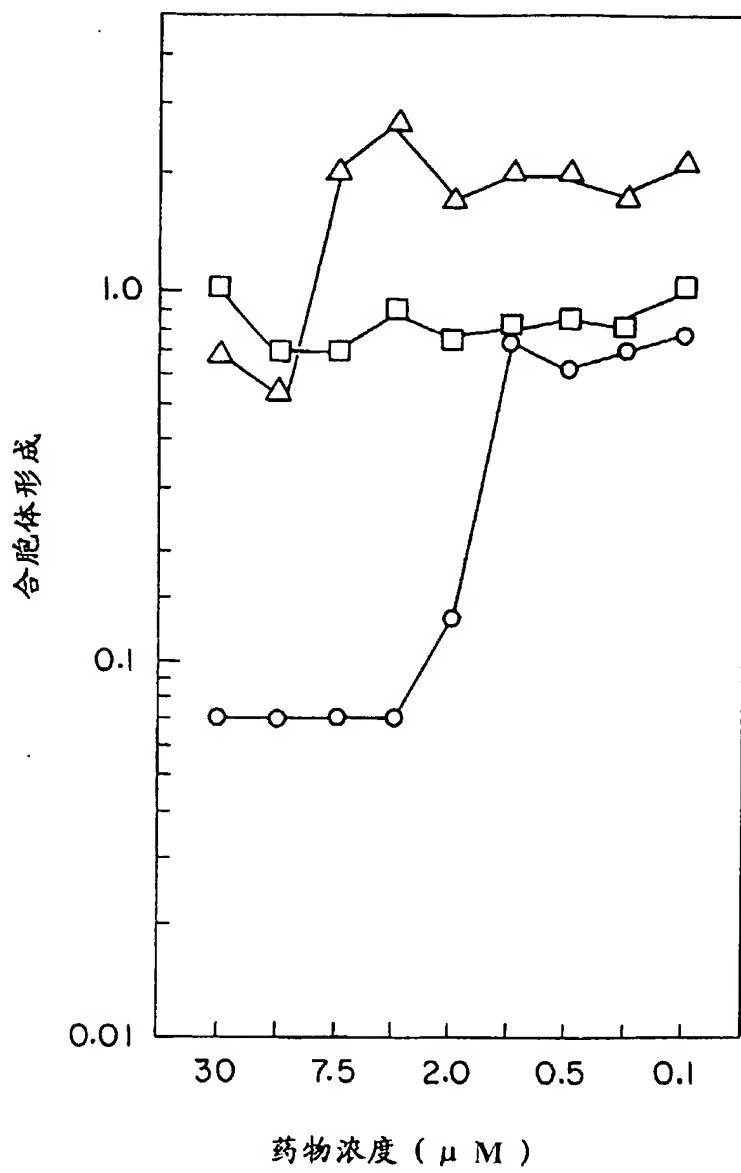


图 3

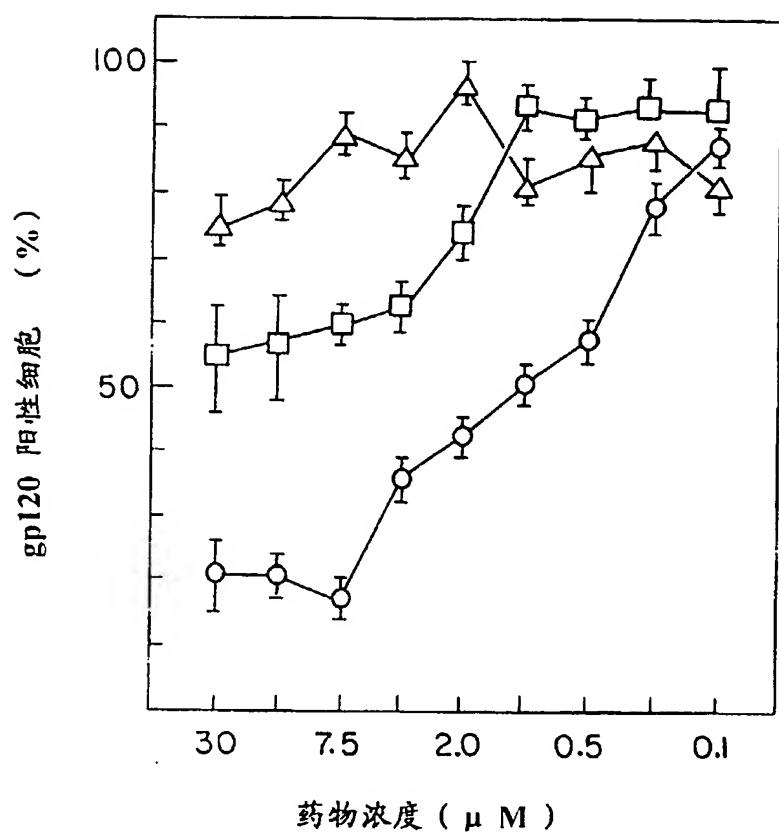


图 4

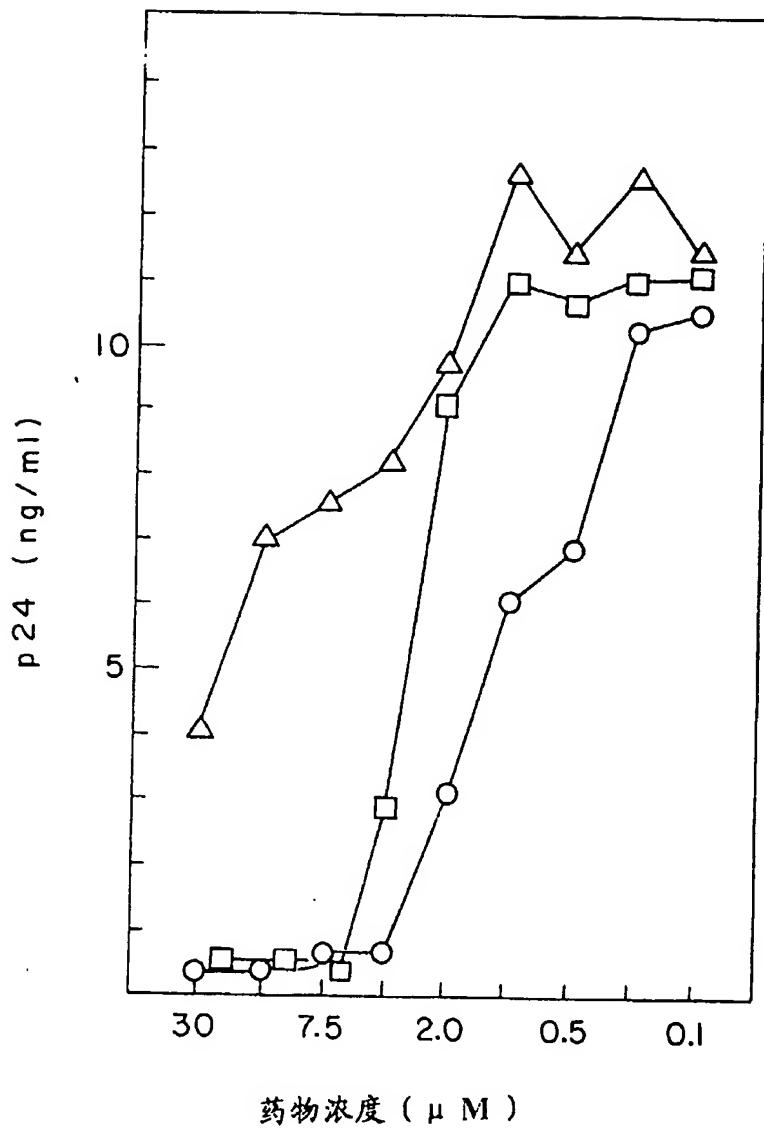
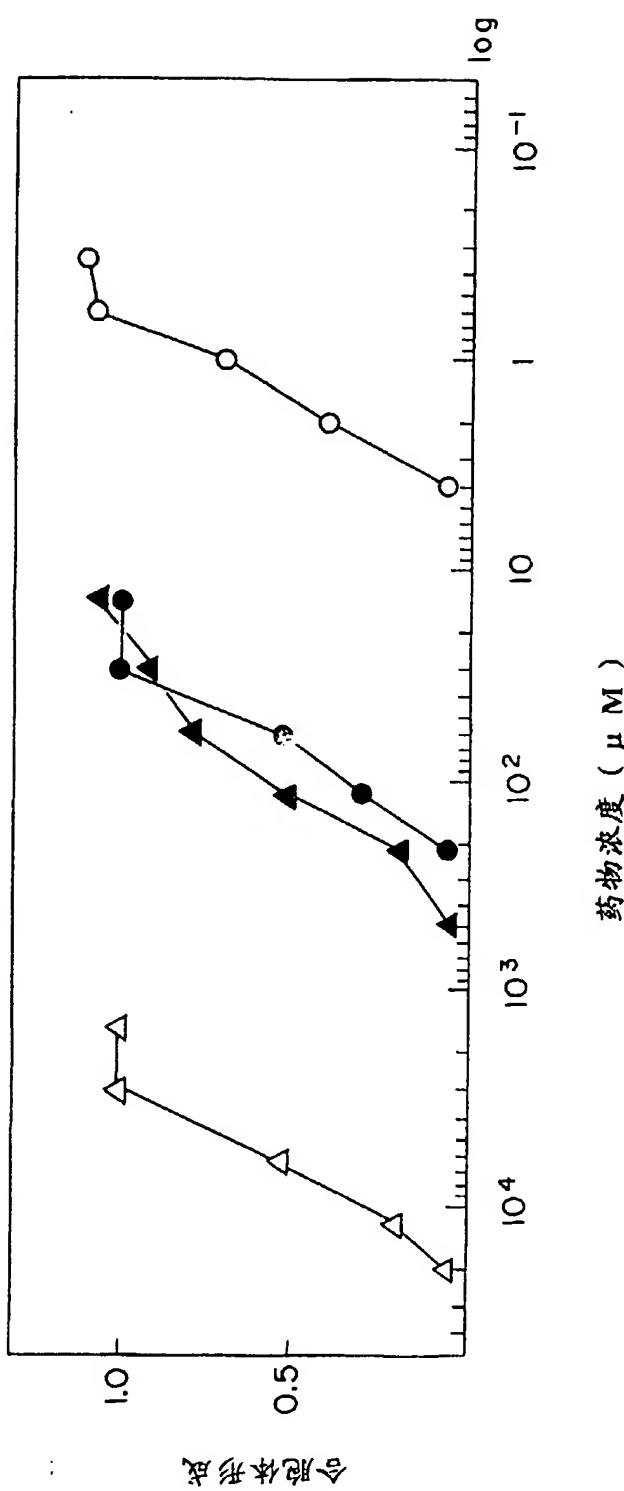


图 5



细胞膜完整性